

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 NOV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

01 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*04

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 @ W / 030103

REMISSÉ PAR
DATE 25 JUIN 2004
LIEU 75 INPI PARIS 34 SP
N° D'ENREGISTREMENT 0407010
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 25 JUIN 2004
PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier
(facultatif) CP 61158BIS

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE
CABINET ARMENGAUD AINE
3, avenue Bugeaud
75116 PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

☐ Demande de brevet

☐ Demande de certificat d'utilité

☐ Demande divisionnaire

Demande de brevet initiale

ou demande de certificat d'utilité initiale

☐ Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

N° _____ Date _____
N° _____ Date _____
N° _____ Date _____

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

" NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES "

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation FRANCE

Date 1 9 1 1 2 0 0 3

N° 03 13 555

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale ☐ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

Code postal et ville

Pays

INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT
(IRD)

213, Rue La Fayette

17 5 4 8 0 PARIS CEDEX 10

FRANCE

FRANÇAISE

N° de télécopie (facultatif)

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

Remplir impérativement la 2^{ème} page

BEST AVAILABLE COPY

REMISE DES PIÈCES DATE: 25 JUIN 2004 LIEU: 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT: 0407010 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI DB 540 W / 191203
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom: PEAUCELLE Prénom: Chantal Cabinet ou Société: CABINET ARMENGAUD AINE Nationalité: Française N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel: 92-1189 Adresse: Rue: 3, Avenue Bugeaud Code postal et ville: 75 011 6 PARIS Pays: FRANCE N° de téléphone (facultatif): 01 45 53 05 50 N° de télécopie (facultatif): 01 45 53 80 21 Adresse électronique (facultatif): armengau@club-internet.fr		
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes: <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) Établissement immédiat: <input type="checkbox"/> ou établissement différé: <input type="checkbox"/> Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS <input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences Le support électronique de données est joint: <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe: <input type="checkbox"/> Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes:		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire: Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 25 juin 2004		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO

Nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses*

- 5 L'invention a pour objet de nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses* chez l'animal et chez l'homme.
Elle vise en particulier des molécules d'acides nucléiques codant pour des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez *Leishmania* et leur utilisation pour produire de tels facteurs afin d'élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.
- 10 Les *leishmanioses* représentent l'une des six maladies parasitaires majeures et sont considérées, à ce titre, comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). Les leishmanies existent sous la forme promastigote extracellulaire, à l'intérieur du tube digestif de l'insecte vecteur (le phlébotome), et sous la forme amastigote intracellulaire, chez l'hôte mammifère. Plusieurs molécules, dont les
- 15 lypophosphoglycane (LPG) ou une métalloprotéase appelée gp63, semblent jouer un rôle important dans le pouvoir infectieux et la pathogénicité du parasite. Plus récemment, une famille de glycoprotéines appelées antigènes de surface de promastigotes, PSA (pour "Promastigote Surface Antigens"), a suscité un intérêt nouveau. Ces PSA sont caractérisées par la présence de motifs répétés riches en
- 20 leucine pouvant intervenir dans les interactions de type protéine/protéine et confèrent une immunité protectrice à médiation cellulaire de type Th 1 chez la souris. Chez des organismes, tels que les bactéries ou les plantes, il est apparu que les PSA étaient impliquées dans des fonctions comme l'adhésion cellulaire, la résistance aux pathogènes et la transduction de signaux.
- 25 Cependant, aucun rôle biologique n'a été décrit, ni suggéré, chez *Leishmania*.
Ce rôle a pu être étudié par les inventeurs grâce à la technique qu'ils détiennent pour cultiver des promastigotes et des amastigotes de *Leishmania* dans des conditions asériques et axéniques, avec un milieu totalement défini, c-à-d dont les constituants sont tous identifiés, et qui fait l'objet du brevet FR 93 05 779 du 13 mai 1993 au nom
- 30 de l'IRD (ex. ORSTOM). La maîtrise de ce procédé leur permet de disposer de formes parasitaires dépourvues des contaminants apportés jusqu'alors par les

milieux de culture, et de déterminants antigéniques sous une forme hautement purifiée.

Dans ledit brevet FR de la Demanderesse, on a déjà décrit l'isolement et l'identification d'une PSA excrétée/secrétée (antigène d'excrétion/secrétion ou AES en abrégé) de 38 kDa et de 45 kDa dans le surnageant de culture de *L. amazoniensis*.

Les inventeurs ont à présent isolé et cloné l'ADNc codant pour cette protéine et procédé à l'évaluation de son rôle dans la biologie du parasite en mettant au point une stratégie de transgénèse additionnelle. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de cette PSA en tant que facteur de virulence et/ou de pathogénicité et d'élaborer des constructions permettant de surexprimer le gène de *Leishmania* codant pour cette PSA, ce qui permet de développer des moyens pour l'obtention de compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences d'acides nucléiques capables de coder pour des PSA de formes promastigotes et de formes amastigotes de *Leishmania*, constituant des facteurs de virulence et/ou de pathogénicité.

Elle vise tout particulièrement à fournir des vecteurs de surexpression de ces PSA, ainsi que des parasites génétiquement modifiés.

L'invention vise en outre les surnageants des milieux de culture des PSA obtenues, ainsi que les PSA isolées, purifiées, et la mise à profit de leurs propriétés pour élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention correspondent à des acides nucléiques isolés capables de coder pour une PSA de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5 et codant pour des PSA de séquences, respectivement, SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention sont plus spécialement des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI*.

L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus. Elle vise en particulier les protéines répondant aux séquences SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°10.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancrage d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, ces protéines répondant à l'une des séquences SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10.

L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI* sont particulièrement préférés.

Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5, ces séquences codant respectivement pour des protéines de séquences SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10.

Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

Elle vise également les souches de *Leishmania* transfectées par de telles constructions qu'il s'agisse de formes promastigotes, ou de formes amastigotes.

Des souches transfectées préférées, compte tenu des applications vaccinales visées, sont des souches de *L.infantum*.

De manière avantageuse les PSA sont produites en grande quantité, de manière constitutive, dans les parasites.

- 10 L'invention vise également un procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* un vecteur tel que défini plus haut, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines
- 15 immunogènes présentes dans des concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.

L'introduction du vecteur dans le parasite est par exemple réalisée par électroporation.

- L'insertion de ces acides nucléiques dans les parasites permet d'augmenter le pouvoir infectieux de ces derniers : leur capacité à survivre dans le macrophage infecté et à
- 20 s'y multiplier est supérieure jusqu'à 5 fois celle du parasite non transfecté par de tels acides nucléiques.

- Lesdites PSA sont produites en grande quantité dans le surnageant du milieu de culture des parasites. L'invention vise donc également les surnageants des milieux de cultures desdits parasites génétiquement modifiés, ainsi que les PSA isolées à partir
- 25 de ces surnageants et purifiées.

L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour répondre à la demande industrielle de disposer de quantités importantes de protéines constituant des facteurs de virulence/pathogénicité chez les *Leishmanies*.

- 30 Grâce à leur pouvoir immunogène, ces protéines permettent d'obtenir, après immunisation d'animaux selon des techniques classiques, des anticorps polyclonaux

et d'élaborer des anticorps monoclonaux. L'immunisation de souris a ainsi permis d'obtenir des anticorps anti Ig G2A et celle de chien des anticorps IgG2.

L'invention vise donc également de tels anticorps et mise à profit de leurs propriétés pour élaborer à une échelle exportable industriellement des compositions vaccinales

5 contre les *leishmanies* chez l'homme ou animal.

Les applications diagnostiques de ces anticorps font également partie de l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence aux figures 1 à 6, qui représentent, respectivement :

- 10 - la figure 1, l'alignement en 3' des séquences nucléotidiques de clones d'ADNc selon l'invention ;
- la figure 2, un schéma récapitulatif des séquences nucléotidiques des clones d'ADNc obtenus après criblage immunologique par un anticorps monoclonal anti-AES des banques d'expression des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis*. Les sites des enzymes de restriction sont indiqués au-dessus de
- 15 chaque séquence ;
- la figure 3A, la localisation de différentes régions protéiques, caractérisées par leur composition particulière en acides aminés, présentes sur la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B, et la figure 3B une représentation schématique de
- 20 la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B codant pour une PSA ;
- la figure 4, les analyses des transcrits par RT-PCR chez les formes promastigotes (P) et amastigotes (A) ;
- la figure 5, le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA, et
- 25 - la figure 6, l'effet de la surexpression d'une PSA de *L. amazonensis* sur le pouvoir infectieux des parasites.

1 - Caractérisation moléculaire des immunogènes majeurs des AES des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. (*Lma* en abrégé)

Cette caractérisation a été effectuée en criblant des banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis* à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'immunogène majeur des AES.

- Caractéristiques des banques d'ADNc :

- 5 Deux banques d'expression d'ADNc, respectivement de formes promastigotes, et de formes amastigotes de *L. amazonensis* ont été réalisées. Les caractéristiques de ces banques sont présentées au tableau I. Les parasites de phase exponentielle et stationnaire ont été mélangés afin d'avoir accès aux différents transcrits pouvant être exprimés au cours des différentes étapes de leur culture *in vitro*. 5 x 10⁴ phages par
- 10 banque ont ensuite été criblés immunologiquement avec l'anticorps monoclonal F5 dilué au 1/500^{ème}. L'obtention de cet anticorps fait l'objet de l'exemple dans le brevet FR mentionné ci-dessus.

Tableau I

Banque d'ADNc Lma LES J4 + J7	Promastigotes	Amastigotes
récoltes J4 + J7	7,8.10 ⁹	7,8.10 ⁹
Titration après packaging	350 000	500 000
Titre après amplification	8,32.10 ⁷ ph/ul	2,16.10 ⁸ ph/ul

- J4 + J7 = parasites récoltés au 4^{ème} jour, en phase exponentielle, et au 7^{ème} jour, en
- 15 phase stationnaire de leur croissance.

- Isolement et séquençage des clones reconnus par l'anticorps monoclonal F5

- 13 clones de la banque promastigote et 11 clones de la banque amastigote se sont révélés positifs. Tous ces clones ont été isolés par criblage
- 20 secondaire et tertiaire.

- L'ADN plasmidique de l'ensemble des clones isolés a été analysé après différentes digestions enzymatiques et les ADNc possédant des inserts de plus grande taille, par digestion *EcoRI/XhoI*, ont été retenus afin d'éliminer les ADNc trop tronqués en 5'. Comme le montre le tableau II, les clones 1A1, 1B1, 2B3, 2C1, 2D1 et 2E1 de la banque
- 25 d'ADNc de promastigotes et les clones A3B, V4A, V5, W2 et W3 de la banque d'amastigotes présentent les inserts de plus grande taille.

L'analyse de ces clones, en déterminant la présence ou non de deux sites d'enzymes de restriction (*Hind*III et *Sal*I) préalablement sélectionnés, a montré qu'ils présentaient une forte homologie de leur séquence nucléotidique.

Par double digestion *Hind*III/*Sal*I, trois classes différentes de clones ont été mises en évidence avec un fragment *Hind*III/*Sal*I d'une taille, respectivement, inférieure à 400 pb (clone 2G1), de 500 pb (clones de type 2C1 et A3B) ou de 600 pb (clones de type 1A1 ou W2). Ainsi cinq types de clones, choisis selon les caractéristiques particulières de leur ADN (la taille de l'insert et la localisation de certains sites d'enzyme de restriction) sont représentés en caractère gras dans le tableau II.

Tableau II

Banque d'ADNc de promastigotes de *Lma*

Clones ADNc	1A1	1B1	1C1	1D5	1F1	2A2	2B3	2C1	2D1	2E1	2F1	2G1	B3 A
Taille des inserts													
EcoRI/XhoI (kb)	2,5	2,5	2-2,2	0,5	2	2(>)	2,5	2,4	2,4	2,4	2	1,7-2	1,7
Carte de restriction													
<i>Sal</i> I	O	O	O	N	N	N	O	O	O	O	N	O	N
<i>Hind</i> III	1,1	1,1	1,1	/	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I (pb)	600	600	500	N	N	N	600	500	500	500	N	<400	N
Expression de protéine recombinant e													
(kDa)	45	/	40	/	/	/	/	42,5	/	/	39	?	18

Banque d'ADNc amastigotes de *Lma*

Clones	A3B	V1B	V2D	V3A	V4A	V5	W1A	W1C	W2	W3	W5
--------	------------	-----	-----	-----	-----	----	-----	-----	----	----	----

ADNc											
EcoRI/XhoI (kb)	2,3	2-2,2	2,2	?	2,3	2,3	2	2	2,3	2,2	1,7
Carte de restriction											
<i>Sall</i>	O	O	O	N	O	O	N	N	O	O	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/Sall</i> (pb)	505	500	500	N	500	500	N	N	600	500<	N
Expression de protéine recombinante											
(kDa)	42,5	/	36,5	/	36,5	43	/	/	45	/	/

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :

le clone de type 1A1 (SEQ ID N°3), qui exprime une protéine de séquences SEQ ID N°8 de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;

le clone 2C1 (SEQ ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1, présentant une séquence SEQ ID N°7.

. le clone 2G1 (SEQ ID N°4), qui a la particularité de posséder un petit fragment *HindIII/SalI*, qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1, présentant une séquence SEQ ID N°9.

- des deux clones suivants de la banque amastigote :

- 5 . les clones de type A3B (SEQ ID N°1), qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa, de séquence SEQ ID N°6 et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique. Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones tronqués du même type ;
- . le clone W2 (SEQ ID N°5), qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa, de
- 10 séquence SEQ ID N°10 et qui présente un fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.

. Etude des cinq séquences d'ADNc

L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les

15 différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions. Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le

20 clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie

25 tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

- 30 Les séquences SEQ ID N°1 à 5, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

- Analyse des différentes séquences protéiques déduites

La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la position du codon d'initiation sur le plasmide pB-SK, dont la transcription est sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ* soumise à l'induction par l'IPTG.

La protéine A3B présente les régions illustrées sur les figures 3A et 3B. En NH₂-terminal, on identifie un peptide hydrophobe, pouvant être clivé, qui est décrit dans la littérature comme un peptide signal de la voie sécrétion. On rencontre ensuite le domaine répété riche en leucine, au nombre de 6 répétitions pour le clone A3B. A une dizaine d'acides aminés de la fin de ce domaine se trouve une région riche en proline, thréonine et sérine, appelée ci-après région poly P/T/S. Cette région est suivie d'une région riche en cystéines, pouvant être impliquée dans des ponts disulfures. Enfin la séquence protéique se termine par un peptide signal hydrophobe.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille, a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2, les sites des enzymes de restriction pour chacun de ces clones Nt=nucléotides ; ATG=codon d'initiation ; TAG=codon stop.

L'analyse sur le banque de donnée PROSITE montre que la protéine A3B possède un site de N-glycosylation localisé à la fin de chaque domaine répété riche en leucine, et 12 sites potentiels de phosphorylations.

L'analyse de la localisation de cette protéine sur le serveur PSORT prédit une localisation cytoplasmique à 92%, ce qui indique que la protéine est soluble. Cette protéine est vraisemblablement ancrée à la surface par un Glycosyl Phosphatidyl Inositol ou GPI. Le peptide signal hydrophobe peut donc être clivé et permettre l'ancrage du GPI au niveau de l'asparagine (D).

Le poids moléculaire théorique de la protéine du clone A3B diffère d'environ 2,9 kDa avec celui des protéines 1A1 et W2, ce qui est en accord avec la différence de 2,5 kDa observée entre les protéines recombinantes correspondantes. Cette différence est due

à la présence d'un nombre variable de répétitions riches en leucines ou LRR, chacune présentant aussi une composition en acides aminés particulière.

Les poids moléculaires apparents et théoriques des quatre types de PSA de l'invention sont rassemblés dans le tableau III suivant.

5

Tableau III

Type de PSA	P.M. de la protéine recombinante	P.M. théorique (non tronquée)	P.M. sans peptide signal (3,2 kDa)
4 LRR (2G1)	/	33,5 kDa	30,3 kDa
6 LRR (A3B)	42,5 kDa	38,5 kDa	35,3 kDa
7 LRR (1A1 et W2)	45 kDa	41,4 kDa	38,2 kDa

2 - Obtention de parasites génétiquement modifiés :

- 10 Le clonage directionnel du gène LaPSA 38s dans le vecteur d'expression pTex a permis d'obtenir une construction capable d'exprimer le gène PSA en position sens. Le plasmide pTex-LaPSA 38s orientation sens et le vecteur pTex vide ont ensuite été électroporés dans la souche sauvage *Leishmania infantum* Mon 1 Clone 1, puis les parasites ont été sélectionnés par la génétycine.
- 15 L'étude a été réalisée sur des parasites de l'espèce *L. infantum* sauvages (Sau), ceux transfectés par le pTex vide (pTex) et ceux transfectés par le pTex contenant la séquence nucléotidique d'intérêt (Sens).

Caractérisation moléculaire :

- 20 L'analyse de l'ADN total par southern blot montre que la construction sens est stable et amplifiée chez la souche transformée. Les résultats sont illustrés sur la figure 4 qui donne les analyses des transcrits par RT-PCR chez les deux formes, promastigotes (P) et amastigotes (A). La figure 5 donne le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA (figure 5A : protéines constitutives ; figure 5B : protéines excrétées / sécrétées)

- 25 Caractérisation phénotypique des mutants :

La comparaison des cinétiques de croissance entre Ldi WT, Ldi pTex et Ldi Sens montre que la surexpression de LaPSA 38s n'interfère pas avec la croissance des parasites. Seule une phase de latence plus longue est observée pour les souches transformées par rapport à la souche sauvage.

- 5 La sensibilité à la lyse par le complément humain a également été étudiée. Récemment, il a été démontré que la PSA de *L. amazoniensis* avait la propriété d'inhiber l'action du complément *in vitro*. Les promastigotes "sens" sont plus sensibles au complément. L'excès de PSA à la surface des parasites peut ainsi entraîner un clivage ainsi qu'une formation de complexes plus importante engendrant une lyse
- 10 accrue.

Etude de pouvoir infectieux des parasites.

- Pour étudier l'effet de la surexpression de LaPSA 38s sur le pouvoir infectieux des parasites, la première approche a consisté à mettre en contact des promastigotes des souches transformées avec des macrophages de chien, qui est le réservoir domestique
- 15 naturel de la *leishmaniose* viscérale.

- Les figures 6A et 6B donnent les résultats obtenus, respectivement, 2 h après contact avec les promastigotes et 48 h après contact avec les amastigotes sur ces figures, l'index parasitaire correspond au % de macrophages infectés par la souche Sens x le nombre de parasites par macrophage / % de macrophages infectés par la souche
- 20 témoin (pTex) x le nombre de parasites par macrophage.

- Les promastigotes surexprimant LaPSA 38s, présentent un pouvoir infectieux 2 fois plus important vis-à-vis des macrophages canins. De plus, après phagocytose, les amastigotes exprimant le transgène possèdent une capacité à survivre et à se multiplier dans la vacuole parasitophore significativement supérieure (2,5 à 5 fois) à
- 25 celle du témoin transfecté par le vecteur vide.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
- 10 2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences comprennent un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
- 15 4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
- 20 5. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles codent pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, ces protéines répondant à l'une des séquences SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10.
6. Protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence choisie parmi SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°10.
- 25 7. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
- 30 8. Souches selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.

9. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.

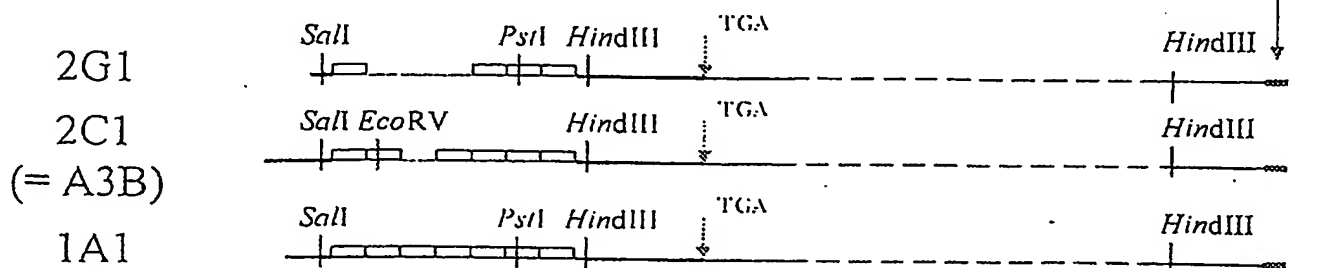
Alignement des différentes séquences ADNc obtenues

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
84

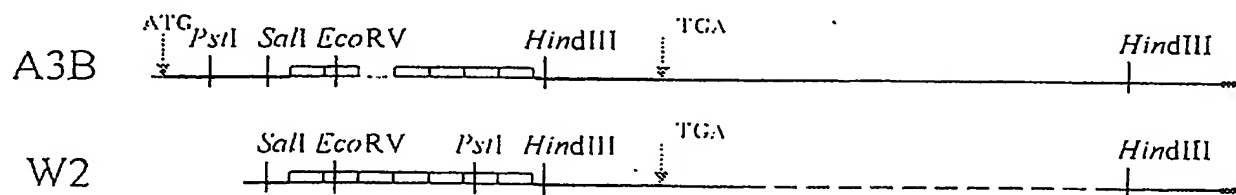
•

•

Clones de la banque ADNc promastigote



Clones de la banque ADNc amastigote



□ = répétition de 72 ou 75 nt - - - - = non séquencé

FIGURE 2

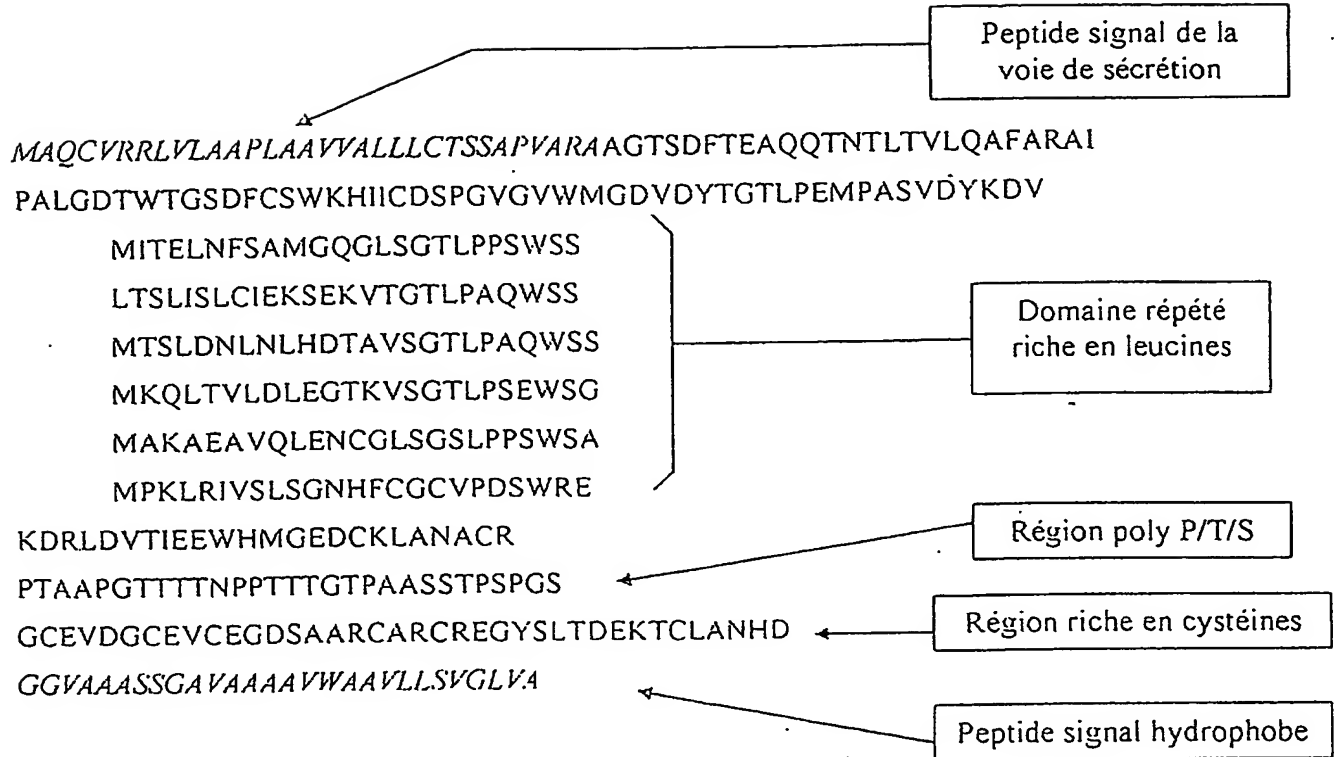


FIGURE 3A

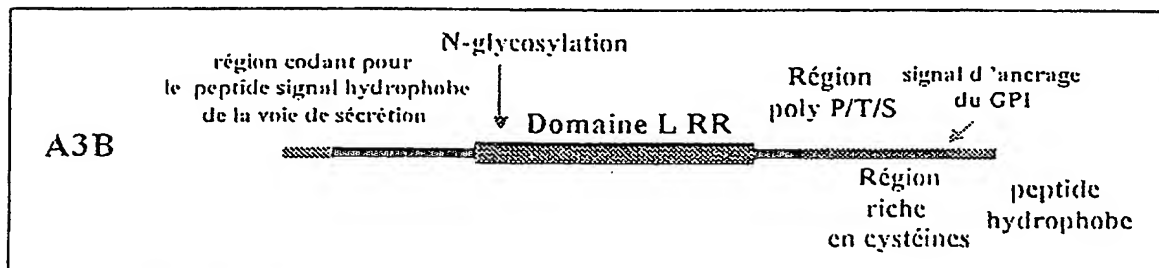


FIGURE 3B

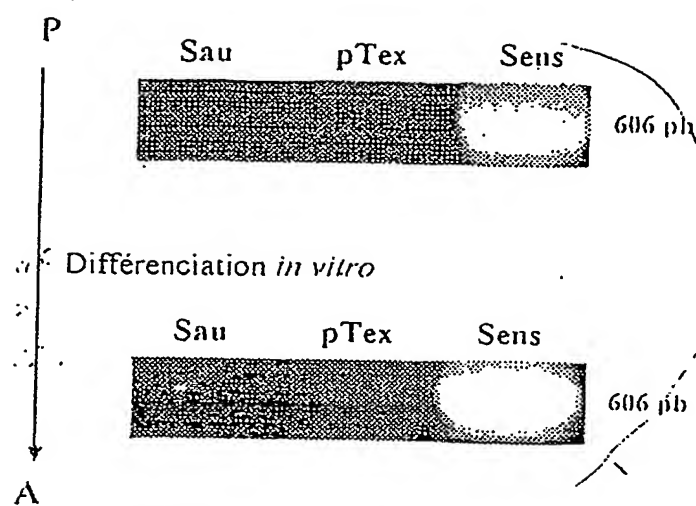
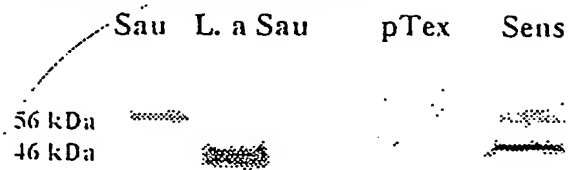


FIGURE 4

-Protéines constitutives

10 μ g par piste ; *L. a* : *Leishmania amazonensis*.

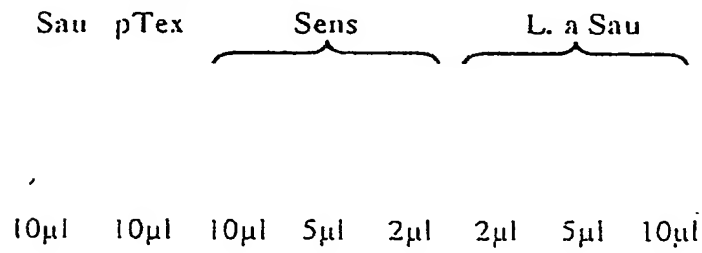
-Protéines excrétées/sécrétées

FIGURE 5

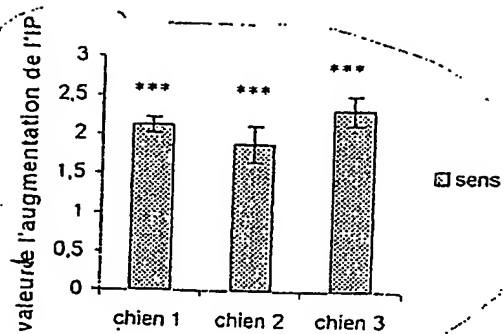


FIGURE 6A

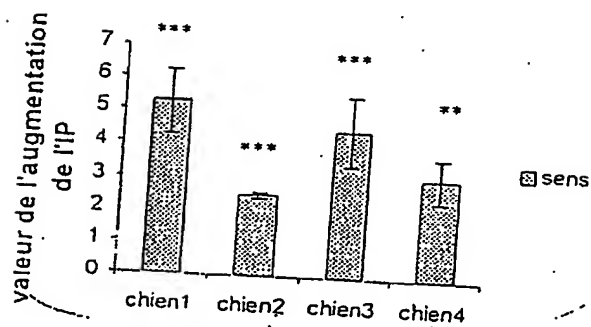


FIGURE 6B

2071FR.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)

<120> NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES

<130> CP/BB 61158BIS-2071

<150> FR 03 13 555

<151> 2003-11-19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2526

<212> DNA

<213> Leishmania amazonensis

<400> 1
gaccctgtt gcgaatggcg cagtgcgtgc gtcggctggt gctggcggcg cccctcgccg 60
ctgtggtggc gctgctgctg tgcacgagca gtgcaccggt ggcgcgctgct gcggggacga 120
gcgacttcac tgaggcgag cagacgaaca cgctgacggt gctgcaggcg tttgcgcgtg 180
cgatccctgc gcttggggac acgtggacgg gcagcgactt ctgctcgtgg aagcacatca 240
tctgcgactc ccccggcgtc ggcgtgtgga tgggcgatgt ggattatacc ggcacgctgc 300
cggagatgcc tgcgagcgtc gactacaagg acgtcatgat cacggaactg aacttcagcg 360
caatgggcca ggggctgagc gggacgctgc cccctcatg gagctcgtg acgtccttga 420
tatcactgtg catcgaaaag tctgagaagg tcaccggcac gctgcctgcc cagtggagct 480
cgatgacgtc gctggacaac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgtgcctg 540
cccagtggag ctcgatgaag cagctgaccg ttctggatct ggagggcact aaggtgtccg 600
gcacgctgcc gtccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggccgtgcag ctggagaact 660
gcggtctgtc cgggagtctg cccctcgt ggtctgcgat gccgaagctg cgtatcgtct 720

2071FR.ST25

cactgagcgg	caaccacttc	tgcgggtgcg	tgcccgactc	gtggagggag	aaggaccgcc	780
tcgatgtgac	catcgaggaa	tggcacatgg	gcgaggactg	caagcttgct	aacgcctgcc	840
gcccgactgc	tgtccggga	acgaccacga	ctaaccgcc	caccaccacc	ggcaccccag	900
cagcctctc	tactccttct	ccagggtcgg	ggtgcgaggt	ggatgggtgt	gaggtgtgcg	960
agggggactc	cgctgcgcgg	tgcgccaggt	gccgtgaggg	ctactccctg	acggacgaga	1020
agacgtgcct	ggcgaaccac	gatggcgggc	tggcggcggc	gtcgagcgga	gcggtggctg	1080
ccgctgctgt	gtgggcggct	gtgctgttga	gcgtggggct	ggtggcgta	gggtgcggcg	1140
ggcacacgcg	cacgcgcaca	cgccgtcgtg	catcgctgt	gctttccgcc	gttgtggcgc	1200
ctgcacggat	gcacgggcat	gcggagggct	gcatgcgtgt	gcgcgtgcca	gctcttgtgt	1260
gtctctccgt	gtggccagca	gtcggcaccc	gcgccgatcg	aatgtgcgcg	cggcggcggt	1320
gtgtcgcctt	ggacagcgga	tgcgggcgcc	cgccctcgc	cgtgtgccct	gcggtctgct	1380
gtgctgccgc	gcgagcgacg	tacggatgcg	ctgtccggcc	ctcttcgacg	gggctcgctt	1440
gcggtgctgt	gctctcgtgg	tctgtgccgg	tgtgccctg	gcggggtgag	agctggcggg	1500
ggcgtgggtg	cgcgcgcggc	agctctccgc	tgcgttgagg	gcggcctgcc	cctgcgtccg	1560
cgcaccgtcg	cgctctcctc	gacgccactg	cgcgcgcttg	ttggcttgct	ttgctctgtc	1620
gtgcgcactc	tctcttattt	tccgtttcat	tcgcctgtat	tctcttctcc	caccgcactg	1680
cggcctcgtc	accgcggccg	tgcgggtgcg	aggcgggtga	tgtgccgttg	tgccccccct	1740
ttcatggcgc	gctgggcca	tcgccctctt	gcctccctcc	tccccctccc	cctcccgcgg	1800
gtcctgtcaa	ttgtatatcc	gtggacctta	tcttcgtact	gcctccgcgc	ctcttcgta	1860
aagcttcgtt	ggcgtgtgcc	gccccccgga	cgtcagcgcc	gctgtgctcg	catgctcacg	1920
gtgcgtcccc	gtgcgtgggc	gtgcacgtaa	ggacatgtat	atatgtatgt	gtatgtatat	1980
gagtatgtat	atatgtacgg	ttatatatat	gaatttgtgt	atgttgaggt	gtatgcatgt	2040
gcgtgcgtat	attagtgtgt	gcgagcacgc	gtgttgccgc	acgctctgct	gccccctcc	2100
gctgtgcgtg	tactcgctg	tgggcgcggg	ggcgggtggc	gccgggtggg	ggcgtgcgg	2160
cgggcggggg	ctcctctgtg	tttctctatt	tctctgttcc	ctgttgacct	caaaaaaaaa	2220
aaaaaaaaaa	aaagtgcacg	taaggacatg	tatatatgta	tgtgtatgta	tatgagtatg	2280
tatatatgta	cggttatata	taggaatttg	tgtatgttga	ggtgtatgca	tgtgcgtgcg	2340
tatattagtg	tgtgcgagca	cgcgtgttgc	gccacgctct	gctgcccgcc	tccgctgtgc	2400
gtgtcactcg	ctgtgggcgc	ggtggcgggt	ggcgcgggt	ggtggccgtg	cggcgggcgg	2460
gggctcctct	gtgtttctct	atttctctgt	tccctgttga	cctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	2520
aaaaaa						2526

<213> Leishmania amazonensis

cgctggacggg	cagcgacttc	tgctcgtgga	agcacatcat	ctgcgactcc	cccggcgtcg	60
gcgtgtggat	gggcgatgtg	gattataccg	gcacgctgcc	ggagatgcct	gcgagcgtcg	120
actacaagga	cgtcatgata	acggaactga	acttcagcgc	aatggggccag	gggctgagcg	180
ggacgctgcc	cccctcatgg	agctcgtga	cgtccttgat	atcactgtgc	atcgaaaagt	240
ctgagaaggt	caccggcacg	ctgcctgccc	agtggagctc	gatgacgtcg	ctggacaacc	300
ttaacctgca	cgacacggcg	gtctccggca	cgctgcctgc	ccagtggagc	tcgatgaagc	360
agctgaccgt	tctggatctg	gagggcacta	aggtgtccgg	cacgctgccg	tccgagtgga	420
gtgggatggc	gaaggccgag	gccgtgcagc	tggagaactg	cggtctgtcc	gggagtctgc	480
ccccctcgtg	gtctgcgatg	ccgaagctgc	gtatcgtctc	actgagcggc	aaccacttct	540
gcgggtgcgt	gcccgactcg	tggagggaga	aggaccgcct	cgatgtgacc	atcgaggaat	600
ggcacatggg	cgaggactgc	aagcttgcta	acgcctgccg	cccgactgct	gctccgggaa	660
cgaccacgac	taaccgcgcc	accaccaccg	gcacccacgc	agcctcctct	actccttctc	720
cagggtcggg	gtgcgaggtg	gatgggtgtg	aggtgtgcga	gggggactcc	gctgcgcggt	780
gcgccaggtg	ccgtgagggc	tactccctga	cggacgagaa	gacgtgcgtg	gcgaaccacg	840
atggcggcgt	ggcggcggcg	tcgagcggag	cggtggctgc	cgctgctgtg	tgggcggctg	900
tgctgttgag	cgtggggctg	gtggcgtgag	ggtgcggcgg	gcccctcttc	tctgtggtgc	960
ccctggtgcc	tgccctcgcc	cccggcacgg	cgctcgtcgt	gccctctctc	acccccacca	1020
gccgacgggg	agaccgacag	ccacacgcgc	acgcgcacac	gccgtcgtgc	atcgcgtgtg	1080
cgtgcactta	aggacatgta	tatatgtatg	tgtatgtata	tgagtatgta	tatatgtccg	1140
gttatatata	ggaatttgtg	tatgttgagg	tgtatgcatg	tgctgtcgta	tattagtctg	1200
tgcgagcacg	cgtgttgccg	cacgctttgc	tgcccgcctc	cgctgtgcgt	gtccctccct	1260
gtgggcgcgc	tgccgggtgg	ccccgggtgg	tgcccgctgc	gcgggcgggg	gctcctctgt	1320
gtttctctat	ttctctgttc	cctgttgacc	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a				1401

<211> 1684

<212> DNA

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 3

```

ggacgggcag cgacttctgc tcgtggaagc acatcatctg cgactcccc ggcgteggcg      60
tgtggatggg cgatgtggat tataccggca cgctgccgga gatgcctgcg agcgtecgact    120
acaaggacgt catgatcatg gcaactggact tcggcgcaat gggccaggga ctgagcggga    180
cgctgcccc ctcattggagc tcgtgacgt ccttgatgtc actgtggatc gaaaagtctg    240
agaaggtcac cggcacgctg cctaccagc ggagctcgat gaagcagctg acccttctgc    300
atctgaaggg cactaagggtg tccggcacgc tgccgccga gtggagtggg atgacgtcgc    360
tggacgacct taacctgcac gacacggcgg tctccggcac gctgcctgcc cagtggagct    420
cgatgaagca gctgatcgat ctggatctgg agggcactaa ggtgtccggc acgctgccgc    480
ccgagtggag tgggatggcg aaggccgagg ccttgacgt gaagtactgc gatctgtccg    540
ggagtctgcc cccctcgtgg tcttcgatgc agaagctgcg tatcgtctca ctgagcggca    600
accacttctg cgggtgcgtg cccgactcgt ggaggagaa ggaccgcctc gatgtgacca    660
tcgaggaatg gcacatgggc gaggactgca agcttgctaa cgctgccgc ccgactgctg    720
ctccgggaac gaccacgact aaccggccca ccaccacgg caccacagca gcctcctcta    780
ctccttctcc agggtegggg tgcgaggtgg atgggtgtga ggtgtgcgag ggggactccg    840
ctgcgcggtg cgcacaggtg cgtgagggct actccctgac ggacgagaag acgtgcctgg    900
cgaaccacga tggcggcgtg ggcgcggcgt cgagcggagc ggtggctgcg gctgctgtgt    960
gggcggctgt gctgttgagc gtggggctgg tggcgtgagg gtgcggcggc cccctcttct 1020
ctgtggtgcc cctggtgcct gccctcgccc ccagcacggc gtcgtcgctg cctctcacc 1080
cccaccagcc gaaggggaga ccgacagcca cacgcacacg cgcacgcgcc gtcgtgcatc 1140
gcgtgtgctt tccgccgttg tggcgccctg gcggatgcac gggcatgcgg aggcgtgcat 1200
gcgtgtgcgc gtgccagctc ttgtgtgtct ctccgtgtgg ccagcagtcg gcacccgcgc 1260
cgatcgaatg tgcgcgcggc ggcggtgtgt cgccttgac agcggatgcg gcgcccgcgc 1320
ctgcgcgtgt gccctgcggt ctgctgtgct gccgcgcgag cgacgtacgg agtgcatgta 1380
aggacatgta tatatgtatg ttaggtata tgagtatgta tatatgtacg gttatatata 1440
ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgcgtgcgta tattagtctg tgcgagcacg 1500
cgtgttgcc caccgtttgc tgccgcctc tgcgtgcgt gtcactccct gtgggcgcgc 1560
tggcgggtgg cgcgggtgg tggcgtgcg gcgggcggg gtcctctgt gtttctctat 1620
ttctctgttc cctgttgacc tcaagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
aaaa

```

1684

<210> 4

<211> 1404

<212> DNA

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 4

```

tcggcgtgtg gatgggcgat gtggattata ccggcacgct gccggagatg cctgcgagcg      60
tcgactacaa ggacgtcatg atcacggaac tgaacttcgg cgcaatgggc cagggactga      120
gcgggacgct gccccctca tggagctoga tgaagcagct gatcgatctg gatctggagg      180
gcactaaggt gtccggcacg ctgccgcccg agtggagtgg gatggcgaag gccgaggccc      240
tgcagctgaa gtactgcgat ctgtccggga gtctgcccc ctcgtggtct tcgatgcaga      300
agctgcgtat cgtctcactg agcggcaacc acttctgcgg gtgcgtgccc gactcgtgga      360
gggagaagga ccgcctcgat gtgaccatcg aggaatggca catgggcgag gactgcaagc      420
ttgctaacgc ctgccgcccg actgctgctc cgggaacgac cacgactaac ccgccacca      480
ccaccggcac ccagcagcc tcctctactc cttctccagg gtcggggtgc gaggtggatg      540
ggtgtgaggt gtgcgagggg gactccgctg cgcggtgcgc caggtgccgt gagggctact      600
ccctgacgga cgagaagacg tgcctggcga accacgatgg cggcgtggcg gcggcgtcaa      660
gcggagcggg ggctgcggct gctgtgtggg cggctgtgct gttgagcgtg gggctggtgg      720
cgtgaggggt gcggcggccc ctcttctctg tgggtgccct ggtgcctgcc ctgccecccg      780
gcacggcgtc gtcgctgccc tctctcacc ccaccagccg acggggagac cgacagccac      840
acgcgcacgc gcacacgccg tcgtgcatcg cgtgtgcttt ccgccgttgt ggcgctgca      900
cggatgcacg ggcattgcgga ggcgtgcatg cgtgtgcgcg tgccagctct tgtgtgtctc      960
tcogtgtggc cagcagtcgg caccgcgcc gatcgaatgt gcgcgcggcg gcggtgtgtc     1020
gccttggaca gcggatgctg gcgccgcc ctcgcgtgtg cctcgggtctg cgtgtcgtgg     1080
ccgcgcgagc gacgtacgga gtgcgctgtg tgcaactaag gacatgtata tatgtatgtg     1140
tatgtatatg agtatgtata tatgtacggg tatatatagg aatttgtgta tgttgaggtg     1200
tatgcatgtg cgtgcgtata ttagtctgtg cgagcacgcg tgttgcgcca cgctttgctg     1260
ccgcctccg ctgtgggtgt cactcgtgtg gggcccggcg gcgggtggcc ccgggtgggtg     1320
cccgttcggc gggcgggggc tectctgtgt ttctctatct ctctgttccc tgttgccctc     1380
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

1404

<210> 5

<211> 1501

<212> DNA

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 5

```

ccggcgtcgg cgtgtggatg ggcgatgtgg attataccgg cacgctgccg gagatgcctg      60
cgagcgtcga ctacaaggac gtcattgatca cggaactgaa cttcagcgca atgggcccagg      120
ggctgagcgg gacgctgccc ccctcatgga gctcgtgac gtccttgata tcaactgtgca      180
tcgaaaagtc tgagaaggtc accggcacgc tgcccgccca gtggagctcg atgacgtcgc      240
tggacaacct taacctgcac gacacggcgg tctccggcac gctgccgccc gaggaggagt      300
ggatgacgtc gctggacgac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgctgcctg      360
cccagtgagg ctcatgaag cagctgatcg atctggatct ggagggcact aagggtgtccg      420
gcacgctgcc gcccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggccctgcag ctgaagtact      480
gcgatctgtc cgggagtctg cccccctcgt ggtcttcgat gcagaagctg cgtatcgtct      540
cactgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgactc gtggagggag aaggaccgcc      600
tcgatgtgac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgcc      660
gcccgactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccggcc caccaccacc ggcaccccag      720
cagcctcttc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg      780
agggggactc cgctgcgcgg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga      840
agacgtgcct ggccaaccac gatggcgggc tggcgggcgg gtcaagcgga gcggtggctg      900
cggctgctgt gtgggcggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgta ggggtgccgc      960
gccccctctt ctctgtggtg cccctggtgc ctgccctcgc cccagcacg gggctcgtcg      1020
tgccctctca ccccaccag ccgaagggga gaccgacagc cacacgcaca cgcgcacgcg      1080
ccgtcgtgca tcgctgtgac tttccgccgt tgtggcgctt gcgcggatgc acgggcatgc      1140
ggaggcgtgc atgcgtgtgc gcgtgccaac tcttgtgtgt ctctccgtgt ggccagcagt      1200
cggcaccctg gcacgtaagg acatgtatat atgtatgtgt aggtatatga gtatgtatat      1260
atgtacggtt atatatagga atttgtgtat gttgaggtgt atgcatgtgc gtgcgtatat      1320
tagtctgtgc gagcacgcgt gttgcgccac gctctgtgac ccgcctctgc tgtgcgtgtc      1380
actcgtgtg ggcgcgctgg cgggtggcgc cgggtggtgg ccgtgcggcg ggcgggggct      1440
cctctgtgtt tctctatttc tctgttcctt gttgacctca agaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1500
a                                                                                   1501

```

<210> 6

<211> 371

<212> PRT

<213> Leishmania amazonensis

<400> 6

Met Ala Gln Cys Val Arg Arg Leu Val Leu Ala Ala Pro Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Val Val Ala Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Pro Val Ala Arg Ala
 20 25 30

Ala Gly Thr Ser Asp Phe Thr Glu Ala Gln Gln Thr Asn Thr Leu Thr
 35 40 45

Val Leu Gln Ala Phe Ala Arg Ala Ile Pro Ala Leu Gly Asp Thr Trp
 50 55 60

Thr Gly Ser Asp Phe Cys Ser Trp Lys His Ile Ile Cys Asp Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Val Gly Val Trp Met Gly Asp Val Asp Tyr Thr Gly Thr Leu Pro
 85 90 95

Glu Met Pro Ala Ser Val Asp Tyr Lys Asp Val Met Ile Thr Glu Leu
 100 105 110

Asn Phe Ser Ala Met Gly Gln Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125

Trp Ser Ser Leu Thr Ser Leu Ile Ser Leu Cys Ile Glu Lys Ser Glu
 130 135 140

Lys Val Thr Gly Thr Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met Thr Ser Leu
 145 150 155 160

Asp Asn Leu Asn Leu His Asp Thr Ala Val Ser Gly Thr Leu Pro Ala
 165 170 175

Gln Trp Ser Ser Met Lys Gln Leu Thr Val Leu Asp Leu Glu Gly Thr
 180 185 190

Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Ser Glu Trp Ser Gly Met Ala Lys Ala
 195 200 205

Glu Ala Val Gln Leu Glu Asn Cys Gly Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro
 210 215 220

Ser Trp Ser Ala Met Pro Lys Leu Arg Ile Val Ser Leu Ser Gly Asn
 225 230 235 240

His Phe Cys Gly Cys Val Pro Asp Ser Trp Arg Glu Lys Asp Arg Leu
 245 250 255

Asp Val Thr Ile Glu Glu Trp His Met Gly Glu Asp Cys Lys Leu Ala
 260 265 270

Asn Ala Cys Arg Pro Thr Ala Ala Pro Gly Thr Thr Thr Thr Asn Pro
 275 280 285

Pro Thr Thr Thr Gly Thr Pro Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly
 290 295 300

Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly Cys Glu Val Cys Glu Gly Asp Ser Ala
 305 310 315 320

Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu Lys
 325 330 335

Thr Cys Leu Ala Asn His Asp Gly Gly Val Ala Ala Ala Ser Ser Gly
 340 345 350

Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Trp Ala Ala Val Leu Leu Ser Val Gly
 355 360 365

Leu Val Ala
 370

<210> 7

<211> 286

<212> PRT

<213> Leishmania amazonensis

<400> 7

Met Gly Asp Val Asp Tyr Thr Gly Thr Leu Pro Glu Met Pro Ala Ser
 1 5 10 15

Val Asp Tyr Lys Asp Val Met Ile Thr Glu Leu Asn Phe Ser Ala Met
 20 25 30

Gly Gln Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ser Leu Thr
 35 40 45

Ser Leu Ile Ser Leu Cys Ile Glu Lys Ser Glu Lys Val Thr Gly Thr
 50 55 60
 Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met Thr Ser Leu Asp Asn Leu Asn Leu
 65 70 75 80
 His Asp Thr Ala Val Ser Gly Thr Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met
 85 90 95
 Lys Gln Leu Thr Val Leu Asp Leu Glu Gly Thr Lys Val Ser Gly Thr
 100 105 110
 Leu Pro Ser Glu Trp Ser Gly Met Ala Lys Ala Glu Ala Val Gln Leu
 115 120 125
 Glu Asn Cys Gly Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ala Met
 130 135 140
 Pro Lys Leu Arg Ile Val Ser Leu Ser Gly Asn His Phe Cys Gly Cys
 145 150 155 160
 Val Pro Asp Ser Trp Arg Glu Lys Asp Arg Leu Asp Val Thr Ile Glu
 165 170 175
 Glu Trp His Met Gly Glu Asp Cys Lys Leu Ala Asn Ala Cys Arg Pro
 180 185 190
 Thr Ala Ala Pro Gly Thr Thr Thr Thr Asn Pro Pro Thr Thr Thr Gly
 195 200 205
 Thr Pro Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
 210 215 220
 Asp Gly Cys Glu Val Cys Glu Gly Asp Ser Ala Ala Arg Cys Ala Arg
 225 230 235 240
 Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu Lys Thr Cys Val Ala Asn
 245 250 255
 His Asp Gly Gly Val Ala Ala Ala Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Ala
 260 265 270
 Ala Val Trp Ala Ala Val Leu Leu Ser Val Gly Leu Val Ala
 275 280 285

<210> 8

<211> 310

<212> PRT

<213> Leishmania amazonensis

<400> 8

Met Gly Asp Val Asp Tyr Thr Gly Thr Leu Pro Glu Met Pro Ala Ser
 1 5 10 15

Val Asp Tyr Lys Asp Val Met Ile Met Ala Leu Asp Phe Gly Ala Met
 20 25 30

Gly Gln Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ser Leu Thr
 35 40 45

Ser Leu Met Ser Leu Trp Ile Glu Lys Ser Glu Lys Val Thr Gly Thr
 50 55 60

Leu Pro Thr Gln Trp Ser Ser Met Lys Gln Leu Thr Leu Leu His Leu
 65 70 75 80

Lys Gly Thr Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met
 85 90 95

Thr Ser Leu Asp Asp Leu Asn Leu His Asp Thr Ala Val Ser Gly Thr
 100 105 110

Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met Lys Gln Leu Ile Asp Leu Asp Leu
 115 120 125

Glu Gly Thr Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met
 130 135 140

Ala Lys Ala Glu Ala Leu Gln Leu Lys Tyr Cys Asp Leu Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ser Met Gln Lys Leu Arg Ile Val Ser Leu
 165 170 175

Ser Gly Asn His Phe Cys Gly Cys Val Pro Asp Ser Trp Arg Glu Lys
 180 185 190

Asp Arg Leu Asp Val Thr Ile Glu Glu Trp His Met Gly Glu Asp Cys
 195 200 205

Lys Leu Ala Asn Ala Cys Arg Pro Thr Ala Ala Pro Gly Thr Thr Thr
 210 215 220

Thr Asn Pro Pro Thr Thr Thr Gly Thr Pro Ala Ala Ser Ser Thr Pro
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly Cys Glu Val Cys Glu Gly
 245 250 255

Asp Ser Ala Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
 260 265 270

Asp Glu Lys Thr Cys Leu Ala Asn His Asp Gly Gly Val Ala Ala Ala
 275 280 285

Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Trp Ala Ala Val Leu Leu
 290 295 300

Ser Val Gly Leu Val Ala
 305 310

<210> 9

<211> 307

<212> PRT

<213> Leishmania amazonensis

<400> 9

Met Cys Val Arg Ile Leu Val Cys Ala Ser Thr Arg Val Ala Pro Arg
 1 5 10 15

Phe Ala Ala Arg Leu Arg Cys Gly Cys His Ser Leu Trp Ala Arg Trp
 20 25 30

Arg Val Ala Pro Gly Gly Ala Arg Ser Ala Gly Gly Gly Ser Ser Val
 35 40 45

Phe Leu Tyr Phe Ser Val Pro Cys Cys Pro Pro Lys Lys Lys Lys Lys
 50 55 60

Lys Lys Ile Gly Val Trp Met Gly Asp Val Asp Tyr Thr Gly Thr Leu
 65 70 75 80

Pro Glu Met Pro Ala Ser Val Asp Tyr Lys Asp Val Met Ile Thr Glu
 85 90 95

Leu Asn Phe Gly Ala Met Gly Gln Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro
 100 105 110

2071FR.ST25

Ser Trp Ser Ser Met Lys Gln Leu Ile Asp Leu Asp Leu Glu Gly Thr
115 120 125

Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met Ala Lys Ala
130 135 140

Glu Ala Leu Gln Leu Lys Tyr Cys Asp Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Ser Trp Ser Ser Met Gln Lys Leu Arg Ile Val Ser Leu Ser Gly Asn
165 170 175

His Phe Cys Gly Cys Val Pro Asp Ser Trp Arg Glu Lys Asp Arg Leu
180 185 190

Asp Val Thr Ile Glu Glu Trp His Met Gly Glu Asp Cys Lys Leu Ala
195 200 205

Asn Ala Cys Arg Pro Thr Ala Ala Pro Gly Thr Thr Thr Thr Asn Pro
210 215 220

Pro Thr Thr Thr Gly Thr Pro Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly
225 230 235 240

Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly Cys Glu Val Cys Glu Gly Asp Ser Ala
245 250 255

Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu Lys
260 265 270

Thr Cys Leu Ala Asn His Asp Gly Gly Val Ala Ala Ala Ser Ser Gly
275 280 285

Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Trp Ala Ala Val Leu Leu Ser Val Gly
290 295 300

Leu Val Ala
305

<210> 10

<211> 310

<212> PRT

<213> Leishmania amazonensis

<400> 10

Met Gly Asp Val Asp Tyr Thr Gly Thr Leu Pro Glu Met Pro Ala Ser
 1 5 10 15

Val Asp Tyr Lys Asp Val Met Ile Thr Glu Leu Asn Phe Ser Ala Met
 20 25 30

Gly Gln Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ser Leu Thr
 35 40 45

Ser Leu Ile Ser Leu Cys Ile Glu Lys Ser Glu Lys Val Thr Gly Thr
 50 55 60

Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met Thr Ser Leu Asp Asn Leu Asn Leu
 65 70 75 80

His Asp Thr Ala Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met
 85 90 95

Thr Ser Leu Asp Asp Leu Asn Leu His Asp Thr Ala Val Ser Gly Thr
 100 105 110

Leu Pro Ala Gln Trp Ser Ser Met Lys Gln Leu Ile Asp Leu Asp Leu
 115 120 125

Glu Gly Thr Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met
 130 135 140

Ala Lys Ala Glu Ala Leu Gln Leu Lys Tyr Cys Asp Leu Ser Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Ser Trp Ser Ser Met Gln Lys Leu Arg Ile Val Ser Leu
 165 170 175

Ser Gly Asn His Phe Cys Gly Cys Val Pro Asp Ser Trp Arg Glu Lys
 180 185 190

Asp Arg Leu Asp Val Thr Ile Glu Glu Trp His Met Gly Glu Asp Cys
 195 200 205

Lys Leu Ala Asn Ala Cys Arg Pro Thr Ala Ala Pro Gly Thr Thr Thr
 210 215 220

Thr Asn Pro Pro Thr Thr Thr Gly Thr Pro Ala Ala Ser Ser Thr Pro
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly Cys Glu Val Cys Glu Gly
 245 250 255

2071FR.ST25

Asp Ser Ala Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
 260 265 270

Asp Glu Lys Thr Cys Leu Ala Asn His Asp Gly Gly Val Ala Ala Ala
 275 280 285

Ser Ser Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Trp Ala Ala Val Leu Leu
 290 295 300

Ser Val Gly Leu Val Ala
 305 310

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2. .

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP/BB 61158Bis-2071	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		06-7010	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
" NOUVEAU MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES "			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
IRD			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LEMESRE	
Prénoms		Jean-Loup	
Adresse	Rue	138, Avenue de Lodève Bât.6, 1D	
	Code postal et ville	34070	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		IRD	
Nom		CAVALEYRA	
Prénoms		Mireille	
Adresse	Rue	53, Rue Copernic	
	Code postal et ville	34000	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		IRD	
Nom		SERONO	
Prénoms		Denis	
Adresse	Rue	12, Avenue de Sète	
	Code postal et ville	34560	POUSSAN
Société d'appartenance (facultatif)		IRD	
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 25 juin 2004			

BEST AVAILABLE COPY

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP/BB 61158Bis-2071	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0467010	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
" NOUVEAU MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES "			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
IRD			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		HOLZMULLER	
Prénoms		Philippe	
Adresse	Rue	Grande Rue	
	Code postal et ville	34560	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		IRD	
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 25 juin 2004		